

4 Diskussion

Um die therapeutischen Mechanismen von IVIG bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen zu verstehen und darüber hinaus auch neue Erkenntnisse über die Pathogenese der Erkrankungen zu erlangen, ist es notwendig, die therapeutischen Komponenten von IVIG zu isolieren (Rhoades et al., 2000; Sewell & Jolles, 2002).

Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit das Fab-Fragment LO31, welches als „IVIG-Target“ aus einer IgG-Bibliothek eines AITP-Patienten isoliert worden war (Jendreyko et al., 1998), in einem antiidiotypischen Biopanning als „Köder“ eingesetzt, um aus einer IgG-Fab-Phagen-Bibliothek eines gesunden Probanden (als Repräsentant für IVIG) (Hoffmann et al., 2000) die Fab-Phagen zu isolieren, die möglicherweise therapeutische Relevanz haben. Als Vorarbeit für das Biopanning und die anschließenden Bindungstests zur Charakterisierung der isolierten Fab-Phagen mussten verschiedene Fab-Fragmente exprimiert und aufgereinigt werden.

4.1 Expression und Aufreinigung von Fab-Fragmenten

Bei der Expression der Fab-Fragmente, die für das antiidiotypische Biopanning und die funktionellen Bindungstests benötigt wurden, stellte sich heraus, dass die verschiedenen Fab-Fragmente in *E. coli* unterschiedlich stark exprimiert wurden. Nur bei einigen wenigen konnte eine Fab-Fragment-Konzentration erreicht werden, die nach der Aufreinigung für weitere Versuche ausreichte. Auch der Versuch, die Expressionsbedingungen durch Variation der Induktionsstärke, der Expressionstemperaturen und der *E.coli*-Wachstumsdichte vor Induktion für jedes Fab-Fragment zu optimieren, brachte keinen Erfolg. Es zeigte sich, dass auch bei optimalen Bedingungen bei einem schwach exprimierenden Klon nur eine geringe Ausbeute an Fab-Fragmenten erzielt werden konnte.

Obwohl nach Deng et al. eine Selektion über Phagenbibliotheken auch immer eine Selektion auf Produzierbarkeit in *E.coli* miteinschließt (Deng et al., 1994), können doch bestimmte Nukleotidabfolgen und damit bestimmte Aminosäuremuster die Expression in *E.coli* dramatisch beeinflussen (Duenas et al., 1995; Knappik & Plückthun, 1995; Ulrich et al., 1995). So scheinen bestimmte Expressions-Proteine einen toxischen Effekt auf *E.coli* zu haben (Krebber et al., 1996), so dass einige Proteine in *E.coli* nicht oder nur schlecht produziert werden können. Ito et al. konnten zeigen, dass schon zufällige Punktmutationen in den CDRs die Expression in *E.coli* behindern können (Ito et al., 1993).

Ein weiterer Erklärungsansatz wäre, dass bestimmte Fab-Fragmente in Form von isolierten Fab-Phagen ein stabiles Protein darstellen, als lösliches Fab-Fragment alleine aber instabil sind.

Als Konsequenz für die schwach exprimierenden Fab-Fragment-Klone ergab sich daher, dass mit dem Expressionssystem *E.coli* bestimmte Fab-Fragmente nicht in ausreichend großer Menge hergestellt werden können.

Da für die Expression kein anderes System zur Verfügung stand, wurden verschiedene säulenchromatographische Aufreinigungsmethoden miteinander verglichen, um die Effizienz des Aufreinigens zu erhöhen. Einen Hinweis auf die Möglichkeit einer Effizienzsteigerung der in der Arbeitsgruppe standardmäßig eingesetzten anti-Fab Affinitätschromatographie ergab

die Bestimmung des relativen Fab-Gehaltes vor und nach der Aufreinigung. Es zeigte sich, dass sich auch nach der Aufreinigung noch eine deutlich nachweisbare Fab-Fragment-Konzentration im Säulendurchlauf befand.

Neben der Aufreinigung mittels anti-Fab wurde die von Fiedler & Skerra beschriebene Aufreinigung mittels thiophiler Adsorption (Fiedler & Skerra, 1999) und die Aufreinigung mittels Protein A getestet. Im Gegensatz zu der von Schulze et al. beschriebenen thiophilen Adsorptionschromatographie (Schulze et al., 1994), die nach der thiophilen Adsorption noch einen zweiten Reinigungsschritt notwendig machte, gelang es Fiedler & Skerra in einem Schritt mittels thiophiler Adsorption ein reines Fab-Fragment zu gewinnen. Auch die Aufreinigung von Fab-Fragmenten durch Protein A Affinitätschromatographie ist umstritten, da nur Fab-Fragmente der V_H3-Familie an Protein A binden (Sasso et al., 1991) und die Methode somit nur eingeschränkt einsetzbar ist.

Bei dem Vergleich der drei Chromatographie-Methoden wurde deutlich, dass nur die anti-Fab Affinitäts-Chromatographie ein für weitere Versuche genügend reines Fab-Fragment lieferte. Die FPLC-Elutionskurven der Aufreinigung mittels Protein A und thiophiler Adsorption wiesen im Vergleich zur Aufreinigung mittels anti-Fab zwar einen größeren Elutionspeak und damit auch eine höhere Proteinkonzentration auf, aber in der SDS-PAGE zeigte sich, dass in den Peak-Fractionen neben den Fab-Fragmenten noch andere Proteine vorlagen. Somit waren diese Aufreinigungsmethoden für das weitere Vorgehen nicht geeignet, da für das Biopanning und die Bindungstests absolut reine Fab-Fragmente benötigt werden, um unspezifische Bindungen auszuschließen.

Es gelang also auch nicht, durch Variation der Aufreinigung eine für weitere Versuche ausreichende Fab-Fragment Menge von einem mittelstark bis schwach exprimierenden Fab-Klon zu gewinnen.

Als Konsequenz konnten für das Biopanning und die Bindungsversuche nicht uneingeschränkt Fab-Klone aus dem Repertoire der Arbeitsgruppe ausgewählt werden, die aufgrund von Bindungseigenschaften und Keimbahngenabstammung interessant waren, sondern es musste zusätzlich auch die Produzierbarkeit in *E.coli* beachtet werden. Es gab daher viele interessante Fab-Klone, die aufgrund von schwacher Expression in *E.coli* für weitere Versuche nicht zur Verfügung standen.

4.2 Isolierung spezifisch LO31-bindender Fab-Phagen

Trotz einer nur mittelgroßen Phagenbibliothek ($1,1 \times 10^6$) konnte eine deutliche Anreicherung von spezifisch LO31-bindenden Fab-Phagen beobachtet werden. Die Menge der eluierten Fab-Phagen stieg mit jeder Biopanning-Runde an. Die einzige Ausnahme bildete der technisch bedingte Abfall des Phagen-Outputs von Runde eins zu Runde zwei, der im Zusammenhang mit der starken Erhöhung der Waschfrequenz zu sehen ist. Auch die Bindung der nach jeder Biopanning-Runde eluierten Fab-Phagen an das Fab-Fragment LO31 verstärkte sich. Hier bildete Runde 5 des Biopanning eine Ausnahme, da hier keine Bindung von Gesamtoutput-Fab-Phagen an LO31 nachweisbar war. Bei diesem Wert handelte es sich aber mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen Artefakt, eventuell verursacht durch zerstörte Fab-Fragmente auf den Phagenoberflächen, da aus dem Output dieser Runde zahlreiche LO31-bindende Einzelklone isoliert werden konnten.

Trotz der beiden Abweichungen konnte der Anstieg des Phagen-Outputs und die Zunahme des prozentualen Anteils der gebundenen Fab-Phagen als offensichtliches Zeichen einer spezifischen Anreicherung gewertet werden.

Es standen also nach fünf Biopanning-Runden zahlreiche Fab-Phagen-Klone zur Verfügung, mit deren Hilfe die antiidiotypische Reaktion zwischen dem Antikörper eines Autoimmunpatienten und den IgG eines gesunden Probanden weiter untersucht werden konnte.

4.3 Charakterisierung spezifisch LO31-bindender Fab-Phagen

4.3.1 Strukturelle Charakterisierung der Fab-Phagen auf molekularer Ebene

Obwohl die Auswahl der zu sequenzierenden Klone anhand des BstNI-Restriktionsmusters getroffen wurde, um möglichst viele unterschiedliche Klone weiter zu untersuchen, lagen nach der Sequenzierung von vier vorausgewählten Klonen lediglich zwei unterschiedliche Fab-Phagen-Klone vor.

Im strukturellen Vergleich unterschieden sich die beiden Klone in vielerlei Hinsicht. Sie zeigten unterschiedliche Keimbahngenabstammung der leichten und schweren Kette und damit auch viele unterschiedliche Nukleotidabfolgen in den CDR- und Gerüstregionen. Auch in der Länge unterschieden sich vor allem die CDR1- und CDR2-Region der beiden Ketten. Da Klon 17 eine größere Homologie zu den Keimbahngensegmenten aufwies, als die drei identischen Klone 12, 40 und 42, war dementsprechend auch die Mutationsrate der V_H - und V_L -Region kleiner.

Bei beiden Klonen zeigte sich, dass die Mutationsrate in den CDR-Regionen größer war als in den Gerüstregionen. Auch die Anzahl von Austausch-Mutationen überwog im Vergleich zu der Anzahl von stillen Mutationen in den CDR-Regionen oftmals. Daraus lässt sich schließen, dass die Mutationen der Keimbahngensequenzen antigen-gerichtet waren.

Interessant im Zusammenhang mit den genetischen Ursprüngen der schweren Kette war die Tatsache, dass beide Klone nicht von der V_H 3-23- oder V_H 3-30 Genfamilie abstammten.

Dies steht im Kontrast zu den durch IVIG selektierten Klonen mittels Phagen Display und antiidiotypischen Biopanning der Arbeitsgruppe (Jendreyko et al., 1998; Hoffmann et al., 2000; Osei et al., 2000; Leucht et al., 2001) und bestätigt, dass die dortige Beobachtung, dass IVIG bevorzugt Klone aus der V_H 3-30 und V_H 3-23-Genfamilie bindet, kein Artefakt darstellte.

4.3.2 Funktionelle Charakterisierung der LO31-bindenden Fab-Phagen

Im ELISA konnte gezeigt werden, dass Fc-Fragment durch die LO31-bindenden Fab-Phagen-Klone nicht gebunden wurde. Dies bestätigt, dass die beiden isolierten Klone durch antiidiotypische Wechselwirkung an das Fab-Fragment LO31 gebunden haben.

Um die Bindungseigenschaften der beiden isolierten Klone näher zu charakterisieren, wurden diese im ELISA auf ihre Bindungsfähigkeit zu anderen Fab-Fragmenten, die unterschiedliche genetische Ursprünge und unterschiedliche Bindungseigenschaften aufwiesen, getestet. Es zeigte sich, dass beide Klone nur das Fab-Fragment LO31 deutlich

banden. Daneben konnte im Vergleich zur Fab-Phagen-Negativkontrolle BSA6 auch eine schwächere Bindung an das Fab-Fragment TCH3, ein Fab-Fragment, das im Rahmen der Neuroblastomforschung als Antiidiotyp gegen den Antikörper ch14.18 isoliert worden war (Uttenreuther-Fischer et al., 2006) und dessen schwere Kette wie bei LO31 von V_H 3-30 abstammt, beobachtet werden. Es konnten daraus aber keine spezifischen Bindungseigenschaften abgeleitet werden, da weder andere Fab-Fragmente mit V_H 3-30-Abstammung, noch andere ch14.18-bindende-Fab-Fragmente aus der Neuroblastomforschung durch die isolierten Fab-Phagen-Klone gebunden wurden. Die Bindung an TCH3 lässt sich daher nur so erklären, dass TCH3 und LO31, im Gegensatz zu den anderen Fab-Fragmenten, einige strukturelle Gemeinsamkeiten haben, die nicht in den konservierten Gerüstregionen der V_H 3-30 Antikörperfamilie liegen oder dass die durch LO31 isolierten Klone eine Ähnlichkeit mit dem Antikörper ch14.18 haben.

Vergleicht man die Bindungseigenschaften der beiden isolierten Fab-Phagen-Klone miteinander, dann fällt auf, dass das Bindungsmuster an andere Fab-Fragmente sehr ähnlich ist. Beide binden das Fab-Fragment LO31 am stärksten, neben einer deutlich schwächeren Bindung an das Fab-Fragment TCH3. Dies ist bemerkenswert, denn obwohl sie sich in ihrer Struktur sowohl in den CDR-Regionen, als auch in den Gerüstregionen erheblich unterscheiden, binden sie doch anscheinend an ein ähnliches Epitop oder werden ähnlich gebunden.

Ein Unterschied ist in der Bindungsstärke zu bemerken. Klon 40 bindet im ELISA ungefähr doppelt so stark an die Fab-Fragmente LO31 und TCH3 wie der Klon 17. Dies kann zwei Gründe haben. Entweder hat Klon 40 eine größere Affinität zu LO31 als Klon 17 oder das Fab-Fragment des Klons 17 kann aufgrund von unter 4.1 genannten Gründen nicht so gut in *E. coli* exprimiert werden. Als Konsequenz würde man dann nach der Fab-Phagen-Produktion viele Phagen finden, die kein Fab-Fragment auf der Oberfläche präsentieren.

Dieses Problem konnte auch durch Vorversuche nicht ausgeschlossen werden. Es wurde zwar durch entsprechende Untersuchungen sichergestellt, dass alle im Bindungs-ELISA eingesetzten Fab-Phagen die gleiche Konzentration haben und an das jeweilig spezifische Antigen binden, aber über das Verhältnis von Fab-präsentierenden- zu nicht-Fab-präsentierenden-Phagen konnte keine Aussage gemacht werden.

4.4 Schlussfolgerungen

Durch ein antiidiotypisches Biopanning mithilfe eines „IVIG-Targets“ ist es gelungen, eine kleine Teilmenge von IVIG zu isolieren (in Form von zwei Fab-Phagen-Klonen), die in der Lage ist, ein thrombozytenbindendes Fab-Fragmente eines AITP-Patienten, das von V_H 3-30 abstammt, spezifisch, antiidiotypisch zu binden.

Die funktionelle Charakterisierung der beiden Fab-Phagen-Klone ergab, dass es sich bei den Isolaten nicht um die postulierte Teilmenge von IVIG handelt, die in der Lage ist, verschieden Fab-Fragmente, die von V_H 3-30 bzw. V_H 3-23 abstammen, superantigenartig zu binden. Diese Folgerung kann man durch die Tatsache ableiten, dass neben dem selektierenden Fab-Fragment mit V_H 3-30 Abstammung keine anderen Fab-Fragmente mit V_H 3-30 Abstammung spezifisch gebunden wurden.

Die ausschließlich spezifische Bindung des selektierenden, thrombozytenbindenden Fab-Fragments deutet dagegen darauf hin, dass es sich bei den isolierten Fab-Phagen-Klonen

um Antikörper handeln könnte, die Autoantikörper binden können, in diesem Fall Autoantikörper gegen Thrombozyten. Solche Antikörper aus IVIG, die gegen krankheitsassoziierte Autoantikörper gerichtet sind, wurden bereits in der Literatur beschrieben. Es konnten neben Antikörpern, die das Glykoprotein IIb/IIIa der Thrombozyten binden, unter anderem auch Antikörper gegen DNA, Thyroglobulin und den Acetylcholinrezeptor in IVIG nachgewiesen werden (Kazatchkine et al., 1994; Rossi & Kazatchkine, 1989).

Die funktionelle Relevanz dieser antiidiotypischen Antikörper wird unterschiedlich diskutiert. Mittels in vitro Versuchen konnte gezeigt werden, dass IVIG und auch Fab-Fragmente, die aus IVIG gewonnen wurden, die funktionelle Aktivität von verschiedenen Autoantikörpern neutralisieren und/oder die Bindung der Autoantikörper an die entsprechenden Autoantigene inhibieren können (Ephrem et al., 2005). In vivo konnte lediglich nachgewiesen werden, dass der Autoantikörpertiter bei Patienten nach der Verabreichung von IVIG abfällt (Sultan et al., 1984) ohne Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Mechanismus.

Bei der AITP wird die antiidiotypische Reaktion ganz widersprüchlich diskutiert. Berchtold et al. konnten zeigen, dass IVIG Antikörper enthält, die mit Autoantikörpern gegen das Glykoprotein IIb/IIIa der Thrombozyten interagieren und den Effekt der Autoantikörper neutralisieren (Berchtold et al., 1989). Barbano et al. dagegen stellten fest, dass IVIG bei der Neutralisation von Autoantikörpern bei AITP-Patienten ineffektiv ist (Barbano et al., 1989).

Einigkeit besteht in der Literatur darüber, dass die antithrombozyten-Antikörper der meisten AITP-Patienten gegen die Oberflächenglykoproteine IIb/IIIa oder Ib/IX der Thrombozyten gerichtet sind (van Leeuwen et al., 1982; Woods et al., 1984; Fujisawa et al., 1993; Hou et al., 1997).

Betrachtet man vor diesem Hintergrund die zwei isolierten Fab-Phagen-Klone, dann stellt sich die Frage: Wie oder an welches Epitop binden diese an das thrombozytenbindende Fab-Fragment? Man könnte sich zum einen vorstellen, dass sie ein Epitop der Thrombozyten, z.B. das Glykoprotein IIb/IIIa oder Ib/IX imitieren und damit als internal image Antikörper binden und so die Bindung des thrombozytenbindenden Fab-Fragments an Thrombozyten verhindern. Vorstellbar wäre aber auch, dass sie als Ak 2 γ (siehe Abbildung 3) an das Fab-Fragment binden und die Bindung des thrombozytenbindenden Fab-Fragments an Thrombozyten verhindern. Als dritte Möglichkeit kommt in Betracht, dass sie außerhalb der Thrombozytenbindungstelle, als Ak 2 α binden, in einer Region, die nicht familiär genetisch konserviert ist. Die Bindung an Thrombozyten wäre damit nicht geblockt und es würde keine neutralisierende Wirkung zustande kommen.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, müssten mit den isolierten Fab-Phagen-Klonen Wettbewerbsversuche durchgeführt werden. In dem Versuchsaufbau müssten die isolierten Klone mit den Thrombozyten um die Bindung an dem thrombozytenbindenden Fab-Fragment konkurrieren. Würden die isolierten Klone eine Bindung der Thrombozyten an das thrombozytenbindende Fab-Fragment verhindern, dann hätte man den Nachweis, dass die isolierten Klone als internal image oder Ak 2 γ binden.

Zur Abklärung einer möglichen therapeutischen Relevanz der isolierten Fab-Phagen müsste der Frage nachgegangen werden, ob durch diese auch die Bindung von Autoantikörpern an das Glykoprotein IIb/IIIa oder Ib/IX verhindert werden kann. Wäre dies der Fall, dann könnte man davon ausgehen, dass die isolierten Klone eine der in der Literatur beschriebenen Teilmengen von IVIG darstellen.

Inwieweit diese Teilmenge aus IVIG für den therapeutischen Effekt bei der Behandlung der AITP verantwortlich ist, ist aber fraglich. Beschreiben doch Jin & Balzasar die Inhibition der Fc γ -Rezeptor-vermittelten Thrombozyten-Elimination als den meist diskutierten und

akzeptierten funktionellen Mechanismus von IVIG bei der Behandlung der AITP (Jin & Balthasar, 2005) und Bierling & Godeau führen aus, dass die Blockade des Fc γ -Rezeptors auf Makrophagen generell als der zugrunde liegende Mechanismus bei der AITP angesehen wird (Bierling & Godeau, 2005). Unbeachtet dessen kommen Jin & Balthasar zu dem Schluss, dass die Inhibition der Fc γ -Rezeptor-vermittelten Phagozytose nicht für alle therapeutischen Effekte verantwortlich sein kann, da auch Fc-freie IVIG-Präparate therapeutische Effekte bei AITP-Patienten auslösen, wenn auch nicht so stark wie komplettes IVIG. Auch eine Besserung der AITP durch IVIG über Monate lässt sich bei einer Halbwertszeit im Blut von ca. 3 Wochen durch Fc-vermittelte Effekte allein nicht erklären (Jin & Balthasar, 2005).

Die Isolierung von Fab-Phagen-Klonen, die nicht superantigenartig mehrere, sondern ausschließlich ein Fab-Fragment binden, ist sehr wahrscheinlich auf die eingesetzte Versuchstechnik zurückzuführen. In dem Biopanning wurde auf Klone selektiert, die mit größter Affinität binden. Geht man davon aus, dass, wie von Silverman für das B-zell-Superantigen Protein A von *Staphylokokkus aureus* beschrieben (Silverman, 1997), Antikörper mit unterschiedlicher Bindungsaktivität und -affinität an ein Superantigen binden, dann ist es durchaus möglich, dass es sich bei der gesuchten IVIG-Teilmenge um schwächer affine Antikörper handelt. Um diese Antikörper, über die man auch die Langzeiteffekte der IVIG-Therapie erklären könnte, zu isolieren, müssten daher die Bedingungen des Biopannings geändert werden, z.B. durch den Einsatz einer IgM-Bibliothek.